



TITLE:

# Structural and functional analysis of pullulanase from *Klebsiella* *pneumoniae*( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Saka, Naoki

---

CITATION:

Saka, Naoki. Structural and functional analysis of pullulanase from *Klebsiella pneumoniae*. 京都大学, 2019, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21819>

RIGHT:

( 続紙 1 )

京都大学	博士（農学）	氏名	坂直樹
論文題目	Structural and functional analysis of pullulanase from <i>Klebsiella pneumoniae</i> ( <i>Klebsiella pneumoniae</i> 由来のプルラナーゼの構造と機能に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>プルラナーゼはプルラン、デンプンやグリコーゲンなどのα-グリカンのα-1,6-グリコシド結合を加水分解するアミラーゼであり、デンプンからマルトースやグルコースを工業的に生産するのに用いられている。市販されている<i>Klebsiella pneumoniae</i>由来のプルラナーゼ（KPP）は、N末端からcarbohydrate binding module（CBM）41、N2、CBM48、A およびCの5つのドメインから構成されている分子量 116,000 のタンパク質である。このうちAドメインが活性ドメインであり、Aドメインはα-アミラーゼを含むGH13ファミリーに属している。KPPについてはこれまでに多くの生化学的性質が報告され、中でもシクロデキストリン（CD）との相互作用についてβ-CDがα-CDとγ-CDよりも本酵素を100倍以上強く阻害する結果が得られているが、CDとの複合体の結晶構造は得られていないため、その構造的理由は不明であった。さらに、KPPは基質アナログとの結合によって触媒残基を含むループの構造が変化する誘導適合変化を示すことが報告されているが、その詳細な機構は明らかにされていない。</p> <p>本論文ではプルラナーゼと3種類のCDとの複合体の結晶を作製してX線結晶構造解析を行い、3種類のCDとの相互作用の相違を明らかにした。また構造解析の結果からCDとの相互作用に重要な役割を果たすと推定されたアミノ酸を変異させたプルラナーゼを作製して、この変異が酵素活性および3種類のCDによる阻害作用に与える影響も明らかにした。次に、KPPの誘導適合変化に関係するアミノ酸を変異させたプルラナーゼの変異体を作製して、その酵素反応パラメーターを検討した。さらに、アポ酵素と基質アナログであるマルトトリオース（G3）との複合体のX線結晶構造解析を行い、KPPが示す誘導適合変化の詳細を明らかにした。</p> <p>第一章では、KPPと3種類のCDとの相互作用を明らかにするために、今まで結晶化が困難であったKPPとCDとの複合体の共結晶化の条件を多数のスクリーニングによって検討し、構造解析可能な結晶を作製することに成功した。この結晶の空間群は従来のC2とは異なりP4<sub>3</sub>2<sub>1</sub>2であり、非対称単位に1分子のKPPを含んでいた。そこで、3種類のCDの濃度を0.1 mM から10 mMまで変化させて共結晶化し、結晶の回折データを SPring-8で測定することにより、1.96 ～ 2.59 Å分解能で構造の精密化を行った。その結果、各CDは本酵素のCBM41およびAドメイン中の活性部位の二箇所に結合することを見出した。しかしCBM41への結合にはCDによる親和性の差が認められないのに対して、活性部位にはβ-CDがα-CDおよびγ-CDよりも10倍以上低濃度でも結合していることが明らかになった。いずれのCDも活性部位のサブサイト+2（触媒部位から還元末端側に2番目のグルコース残基が結合する部位）付近に存在するPhe746の側鎖をCDの内側に包接した結合をするが、α-CDはPhe746の側鎖と多くの衝突をし、またγ</p>			

-CDはPhe746の側鎖とほとんどファンデルワールス相互作用をとらないのに対して、 $\beta$ -CDはPhe746の側鎖と多くの適切な距離のファンデルワールス相互作用をとっていることが明らかになった。Phe746の側鎖がCDの結合に及ぼす影響を評価するために、*K. pneumoniae* プルラナーゼ遺伝子が大腸菌で発現した酵素 (PulA)とそのF746A変異体についてCDの阻害定数を求めたところ、3種類全てのCDでその阻害定数が大きくなり、特に $\beta$ -CDでは1000倍以上大きくなって阻害作用が顕著に弱まった。以上より、 $\beta$ -CDがKPPを強く阻害する理由は $\beta$ -CDとPhe746の側鎖との最適なファンデルワールス相互作用に起因することを明らかにした。

第二章では、KPPの活性部位に存在する触媒残基 (Glu706) 付近のループ部分 (706-710) が基質アナログであるマルトオリゴ糖の結合によって構造変化を生じる誘導適合変化の機構について検討した。市販のKPPとアミノ酸配列の相同性が高いGH13のサブファミリー13に属するプルラナーゼのアミノ酸配列を比較すると706-710のループ部分のすぐ近傍に存在するLeu680がPulAを含む他のプルラナーゼではGlyで保存されていることが明らかになった。そこでPulAおよびPulA-G680Lを大腸菌で発現させてその酵素活性を調べた結果、PulA-G680Lの速度パラメーターはKPPと類似しており、PulAよりもプルランに対する活性が低下することが明らかになった。次に、PulAおよびPulA-G680Lのアポ型およびG3複合体の結晶化を行い、回折データをSPRING-8で測定することによって、1.30 ~ 1.84 Å分解能で構造の精密化を行った。その結果、PulAでは706-710のループ構造がアポ体とG3複合体で変化していなかったが、PulA-G680Lではアポ体とG3複合体でループ構造が変化し、PulA-G680Lのアポ型の構造のみがPulAのアポ型、PulAのG3複合体およびPulA-G680L変異体のG3複合体の構造とは異なることが明らかになった。680番目の残基とループ上の残基との相互作用を調べると、Gly 680はGlu706とSer710と相互作用するのに対して、Leu680はループの全ての残基と相互作用をしており、ほとんどの残基と衝突する距離にあることが明らかになった。また、PulA-G680Lのアポ型のループ上の残基の主鎖の二面角は不安定な領域にあることが示され、基質との結合によってより安定な構造に変化することが推定された。以上より、KPPで報告されたループ 706-710の結晶中での構造変化はLeu680の側鎖とループ上の残基との相互作用に起因するものであり、この構造変化はプルランに対する活性の低下をもたらすことを明らかにした。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

タンパク質の機能をその結晶構造から解明するためには、その機能に関連する構造変化が溶液状態と同様に再現できる結晶を用いなくてはならない。このためには多数の結晶化スクリーニングによって最適な結晶化条件を検討する必要がある。また、タンパク質の機能解明のためには部位特異的変異によるアミノ酸残基の変異が有効であり、変異体タンパク質と基質アナログとの複合体結晶のX線結晶構造解析が不可欠である。本論文が対象とした*Klebsiella pneumoniae*由来のプルナーゼ(KPP)では、先行研究によってアポ酵素およびマルトオリゴ糖との複合体の構造は明らかにされていたが、阻害剤となるCDとの複合体の結晶は得られておらず、CDとの相互作用の詳細は不明であった。また、先行研究によって見出された活性部位の誘導適合変化の機構の詳細についても不明であった。本論文ではこれらの点を解明するために、CDとの複合体結晶の結晶化条件のスクリーニングを徹底的に行って、解析可能な結晶を得ることに成功した。また、CDの結合や誘導適合変化に関係するアミノ酸残基の変異体の機能を調べ、その構造解析を行って、機能と構造との相関を明らかにした。本論文で評価できる点は以下の通りである。

1. 従来の方法では困難であったKPPとCDとの複合体の結晶化条件をスクリーニングによって見出し、そのX線結晶構造解析を行った。3種類のCDの結合を検討した結果、CDの環の内部とPhe746の側鎖との相互作用がCDの種類によって異なり、 $\beta$ -CDがPhe746の側鎖と最も適切なファンデルワールス相互作用をとっていることを明らかにした。さらに、Phe746をAla746に置換して、酵素反応の阻害を調べた結果、3種類全てのCDでその阻害作用が弱まり、特に $\beta$ -CDで作用の低下が顕著であった。以上より、 $\beta$ -CDがKPPを強く阻害する理由は、Phe746の側鎖との最適な相互作用に起因することを明らかにした。
2. KPPで報告された活性部位の誘導適合変化の機構を明らかにするために、PulAのGly680をLeuに変異したPulA-G680Lを作製して、その酵素反応パラメーターをPulAと比較し、それぞれアポ型とG3複合体のX線結晶構造解析を行った。その結果、PulA-G680LはPulAに比べてプルランに対する活性が低下することとKPPで報告されたループ706-710の結晶中での構造変化はLeu680の側鎖とループ上の残基との相互作用に起因することを明らかにした。

以上のように、本論文は変異体と基質アナログ複合体の詳細なX線結晶構造解析によって、今まで不明であったプルナーゼとCDとの相互作用の詳細と基質によって誘導される活性部位の構造変化の機構を明らかにしたもので、構造生物学、酵素科学の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成31年2月12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)